

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520131153534

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

切断单侧角膜神经对于双侧角膜上皮屏障功能的影响

**The effects of unilateral corneal nerve disconnection on
bilateral corneal epithelial barrier function**

刘 凡 菲

指导教师姓名: 陈文生 副 教 授

专 业 名 称 : 眼 科 学

论文提交日期: 2016 年 04 月

论文答辩时间: 2016 年 05 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

中文摘要

目的：正常的角膜上皮屏障具有维持眼表内环境稳态，保护角膜免受外来侵袭的功能。目前已知眼外伤、炎症、代谢紊乱、局部用药等因素会引起角膜上皮表层细胞连接蛋白分布及表达量改变，进而导致上皮屏障功能破坏。屏障功能障碍是多种眼表疾病发生、发展的病理学基础。角膜神经也被证实与角膜上皮之间存在着相互沟通和联系。本研究拟探讨切断单侧角膜神经后，双侧上皮屏障功能的变化，并揭示出现这种变化的可能作用机制。

方法：将正常的wistar大鼠随机分成3组即：空白对照组，环钻处理组，划“×”组，每组30只。分组后，空白对照组不做处理。环钻处理组使用3.00mm带芯环钻从角膜上皮向基质钻入，深度为角膜基质层2/3，对侧眼不做处理。划“×”组用刀片在角膜上划直径为3.00mm的两条相互垂直的线段，同样的对侧眼不做处理。处理后的第1天、7天、14天，做如下临床指标检测：1.角膜知觉测量，2.角膜荧光素钠染色，3. 泪液分泌实验。用苏木素伊红（HE）染色观察角膜上皮细胞层的形态学变化。免疫荧光染色观察紧密连接标记物ZO-1，粘着连接标记物E-cadherin以及细胞增殖标记物Ki67的分布和表达。TUNEL试剂盒检测角膜上皮细胞凋亡的情况。Western blot和Real-time PCR技术检测角膜上皮ZO-1的蛋白和mRNA表达水平。Real-time PCR检测角膜的P物质（substance P, SP）、神经肽-1受体（neurokinin-1 receptor, NK-1R）、白介素-1 β （interleukins-1 β , IL-1 β ）、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）、血管内皮生长因子-a（vascular endothelial growth factor-a, VEGF-a）的mRNA表达。

结果：环钻切断大鼠单侧角膜神经后，与空白对照组相比，环钻组和环钻对侧组的角膜知觉、泪液分泌下降，角膜荧光素钠染色评分升高。处理后各组的角膜上皮细胞形态无明显变化。角膜神经免疫荧光染色结果显示，环钻切断角膜神经后，环钻组角膜上皮神经密度降低，环钻切入的角膜中央区域2周后无神经分布。环钻对侧组的角膜上皮神经密度也降低。环钻组、环钻对侧组的角膜上皮ZO-1、E-cadherin的形态与分布错乱结构不完整，ZO-1的蛋白与mRNA的表达量下调。在环钻组与环钻对侧组中，增殖和凋亡的细胞处于活跃的状态。环钻组与

环钻对侧组角膜的P物质及其受体NK-1R的mRNA表达水平在处理后的升高，同时炎症因子IL-1 β 、TNF- α 、VEGF-a的mRNA表达水平都有所升高。划“ \times ”组的ZO-1和E-cadherin的分布在处理后第1天排列不整齐，P物质、NK-1R、IL-1 β 、VEGF-a的mRNA表达量在处理后的第1天表达上调，在第7、14天与对照组相比无显著变化。划“ \times ”处理眼的对侧组在上述的观察指标中与对照组相比均无明显变化。

结论：切断单侧的角膜神经后，出现双侧角膜上皮屏障功能的破坏。同时我们发现，角膜神经破坏后双侧角膜中P物质、NK-1R和炎症因子的表达量也上调。切断角膜神经引起的角膜上皮屏障功能破坏，可能由于P物质及炎症因子表达上调所致。

关键词：角膜神经；上皮屏障；炎症

ABSTRACT

Purpose: Normal corneal epithelial barrier plays a important role in maintaining corneal homeostasis and protect cornea from invastion. At present we already know that ocular trauma, inflammation, metabolic disorders could change the distribution and expression of corneal superficial epithelium junction, and could lead to dysfunction of corneal epithelial barrier function. Corneal epithelial barrier dysfunction is the pathological basis of various ocular surface diseases. It has been confirmed that corneal nerves could communicate and contact with corneal epithelium. Our study intended to explore the effect of bilateral corneal epithelial barrier function after severing unilateral corneal nerves, and the possible mechanism of this phenomenon.

Method: The normal wistar rats were randomly divided into three groups by different methods: control group, trephine treated group, scratched "×" group, each group had 30 rats in it. Trephine treated group means we used 3.00 mm diameter core trephine cut from corneal epithelium to stromal, which was about two-thirds of corneal stromal layer deep, the contralateral eye didn't do any test. We scratched two perpendicular lines about 3.00 mm diameter with a blade paddle on the cornea. The contralateral eye didn't do any test. Then we assessed the ocular surface of experimental rats on day 1, day 7, day 14, did the following clinical index detection: 1. corneal sensation, 2. sodium fluorescein staining, 3. tear secretion measurement. We did hematoxylin-eosin (HE) staining to observe the morphological changes in corneal epithelium, and whole mount corneas were analyzed by fluorescence confocal microscopy to observe the presense of tight junction marker ZO-1 and adhesive junction marker E-cadherin, substance P and cell proliferation markers Ki67 in cornea epithelium. TUNEL kit was used to detect corneal epithelial cells apoptosis. Western blot and Real-time PCR technique were used to detect ZO-1 protein and mRNA expression level. Evaluated the cornea mRNA expression of substance P,

neurokinin-1 receptor (NK-1R) , interleukins-1 β (IL-1 β) , tumor necrosis factor- α (TNF- α) , vascular endothelial growth factor-a (VEGF-a) by Real-time PCR .

Results: After severing unilateral corneal nerves of rats, bilateral corneal sensation and tear secretion are both decreased, corneal sodium fluorescein staining scores were bilateral rised. The corneal epithelium morphology didn't change significantly in each group. Fluorescein staining showed that after severing the corneal nerves, the corneal nerves density was reduced. The center corneal area cutted by trephine had no nerves after 2 weeks. The contralateral eye of trephine group corneal nerves density was reduced too. The distribution of ZO-1 and E-cadherin were dispersed in the bilateral cornea of trephine group. The protein and mRNA expression of ZO-1 in the trephine treated group were reduced in bilateral corneal epithelium. In the bilateral cornea of trephine group, proliferation and apoptosis cells were active compared with control group. In the bilateral cornea of trephine group substance P and NK-1R mRNA expression level were increased, and inflammatory factor IL-1 β , TNF- α , VEGF-a mRNA expression level were increased as well. Scratch "×" group the distribution of ZO-1 and E-cadherin as well as the mRNA expression of substance P, NK-1R, IL-1 β , VEGF-a were changed only on the first day, but showed no significant changes after 7 and 14 days. The scrach "×" group contralateral eye had no significant changes compared with the control group.

Conclusion: After severing the unilateral corneal nerves, bilateral corneal epithelial barrier function disfunction occurred. Meanwhile we found that bilateral corneal substance P, NK-1R expression and inflammatory cytokines were also increased after severing the corneal nerves. Corneal epithelial barrier disfunction was caused by corneal nerves damage; it's probably due to the upregulation of substance P and inflammatory cytokines.

Key words: corneal nerves; barrier function; inflammation

目 录

中文摘要	I
ABSTRACT	III
目录	V
第一章 前言	1
1.1 角膜的组织结构和生理功能	1
1.1.1 角膜的组织结构	1
1.1.2 角膜神经	2
1.1.3 角膜的生理功能	4
1.2 角膜上皮屏障功能的研究现状	4
1.2.1 参与构成角膜上皮屏障的主要蛋白及其功能	5
1.2.2 角膜上皮屏障功能的检测方法	6
1.2.3 引起角膜上皮屏障功能破坏的常见原因	6
1.2.4 促进角膜上皮屏障功能恢复的药物	9
1.3 P 物质的结构、分布和功能	11
1.3.1 P 物质的结构和分布	11
1.3.2 P 物质在全身的作用	12
1.4 角膜神经与角膜上皮之间的功能联系	14
1.5 单侧角膜神经病变与双侧角膜疾病的关系	15
1.6 课题背景	16
第二章 实验材料与方法	17
2.1 实验动物	17
2.2 主要实验试剂	17
2.2.1 化学试剂	17
2.2.2 常用抗体	18

2.2.3 实验仪器设备	19
2.2.4 引物及其配制	20
2.3 常用试剂的配置方法	21
2.3.1 组织染色相关溶液	21
2.3.2 蛋白质抽提及电泳相关溶液	22
2.3.3 其他溶液	23
2.4 实验方法	24
2.4.1 实验动物分组和处理	24
2.4.2 实验过程	24
2.4.3 临床指标检测	24
2.4.4 石蜡切片的制备	25
2.4.5 苏木素-伊红染色 (HE 染色)	27
2.4.6 Whole mount 免疫荧光	27
2.4.7 Western Blot 免疫印迹分析	28
2.4.8 TUNEL 凋亡试剂盒检测	31
2.4.9 mRNA 的提取、逆转录与 Real-time PCR	32
2.5 统计学分析	34
第三章 实验结果	35
3.1 处理后角膜上皮荧光素钠染色图	35
3.2 临床实验指标检测	35
3.2.1 角膜知觉	35
3.2.2 角膜荧光素钠染色评分	36
3.2.3 泪液分泌	37
3.3 苏木素伊红 (HE) 染色	38
3.4 处理后角膜神经的变化	39
3.4.1 处理后第 1 天角膜神经变化	40
3.4.2 处理后第 7 天角膜神经变化	40
3.4.3 处理后第 14 天角膜神经变化	41
3.4.4 处理后角膜上皮神经分布密度分析	42

3.5 处理后对角膜上皮屏障功能的影响	43
3.5.1 中央角膜上皮 ZO-1 的分布情况	43
3.5.2 中央角膜上皮 E-cadherin 的分布情况	44
3.5.3 中央角膜上皮肌动蛋白骨架的分布情况	45
3.6 角膜上皮基底层细胞增殖的表达变化情况	46
3.7 角膜上皮层细胞凋亡的表达变化情况	48
3.8 角膜上皮 ZO-1 的表达变化情况	49
3.9.1 角膜上皮 ZO-1 的蛋白表达量	49
3.9.2 角膜上皮 ZO-1 的 mRNA 表达量	51
3.9 中央角膜上皮 P 物质表达变化情况	52
3.10 P 物质的 mRNA 表达量变化	53
3.11 NK-1R 的 mRNA 表达量变化	54
3.12 角膜炎症因子表达变化	55
3.12.1 IL-1 β 的 mRNA 表达变化情况	55
3.12.2 TNF- α 的 mRNA 表达变化情况	56
3.12.3 VEGF-a 的 mRNA 表达变化情况	57
第四章 讨论	59
4.1 环钻处理后角膜神经的变化	60
4.2 切断角膜神经后常见临床指标的变化	60
4.3 切断单侧角膜神经后角膜上皮屏障的变化	61
4.4 切断单侧角膜神经后角膜上皮细胞的增殖和凋亡变化	62
4.5 切断单侧角膜神经后角膜 P 物质的表达	62
4.6 切断单侧角膜神经后角膜 NK-1R 的表达变化	63
4.7 切断单侧角膜神经后角膜炎症因子的变化	64
第五章 全文总结	66
参考文献	67
致 谢	74
硕士在读期间科研成果	75

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Table of contents in Chinese	V
Table of contents in English	VIII
Chapter 1 Introduction	1
1.1 The structure and physiological functions of cornea	1
1.1.1 Corneal structure	1
1.1.2 Corneal nerves	2
1.1.3 Corneal physiological functions	4
1.2 The recent studies of corneal epithelial barrier function	4
1.2.1 The proteins constituted corneal epithelial barrier and their function	5
1.2.2 Methods of measuring corneal epithelial barrier function	6
1.2.3 The common causes of cornea epithelial barrier dysfunction	6
1.2.4 The drugs for promoting the recovery of corneal epithelial barrier function	9
1.3 The structure, distribution and function of substance P	11
1.3.1 The structure and distribution of substance P	11
1.3.2 The role of substance P in our body	12
1.4 The relationship between corneal nerves and corneal epithelium	14
1.5 The relationship between unilateral corneal neuropathy and bilateral corneal disease	15
1.6 The backgroud of this project	16
Chapter 2 Materials and methods	17
2.1 Experimental animals	17

2.2 Experimental reagents	17
2.2.1 Chemical reagents	17
2.2.2 Antibodies	18
2.2.3 Laboratory instruments and equipments	19
2.2.4 Primers and their preparation	20
2.3 Methods of configuring reagents	21
2.3.1 Tissue staining solution	21
2.3.2 Protein extraction and electrophoresis related solution	22
2.3.3 Other solution	23
2.4 Experimental methods	24
2.4.1 The grouping and processing of experimental animals	24
2.4.2 Experimental process	24
2.4.3 Clinical index detection	24
2.4.4 Preparation of paraffin section	25
2.4.5 HE staining	27
2.4.6 Whole mount immunofluorescence	27
2.4.7 Western blot	28
2.4.8 TUNEL	31
2.4.9 The extraction of mRNA, reverse transcription and Real-time PCR	32
2.5 Statistical analysis	34
Chapter 3 Experimental results	35
3.1 The corneal epithelial sodium fluorescein staining after the treatment	35
3.2 Clinical index detection	35
3.2.1 Corneal sensitivity	35
3.2.2 Corneal fluorescein staining scores	36
3.2.3 Schirmer test	37
3.3 HE staining	38
3.4 The changes of corneal nerves	39
3.4.1 The changes of corneal nerves on day 1	40

3.4.2 The changes of corneal nerves on day 7	40
3.4.3 The changes of corneal nerves on day 14	41
3.4.4 The density of corneal epithelium nerves after the treatment	42
3.5 The changes of corneal epithelial barrier function	43
3.5.1 The distribution of ZO-1 in central corneal epithelium	43
3.5.2 The distribution of E-cadherin in central corneal epithelium	44
3.5.3 The distribution of F-actin in central corneal epithelium	45
3.6 The expression of proliferation cells in corneal basal epithelium	46
3.7 The expression of apoptosis cells in corneal epithelium	48
3.8 The expression of ZO-1 in corneal epithelium	49
3.8.1 The protein expression of ZO-1 in corneal epithelium	49
3.8.2 The mRNA expression of ZO-1 in corneal epithelium	51
3.9 The expression of substance P in central corneal epithelium	52
3.10 The mRNA expression of substance P in cornea	53
3.11 The mRNA expression of NK-1R in cornea	54
3.12 The changes of inflammatory cytokines in cornea	55
3.12.1 The mRNA expression of IL-1 β in cornea	55
3.12.2 The mRNA expression of TNF- α in cornea	56
3.12.3 The mRNA expression of VEGF-a in cornea	57
Chapter 4 Discussion	59
4.1 The changes of corneal nerves after processing with trephine	60
4.2 The changes of clinical index after cutting off unilateral corneal nerves	60
4.3 The changes of corneal epithelial barrier after cutting off unilateral corneal nerves	61
4.4 The changes of proliferation and apoptosis cells in corneal epithelium after cutting off unilateral corneal nerves	62
4.5 The expression of substance P in cornea after cutting off unilateral corneal nerves	62
4.6 The expression of NK-1R in cornea after cutting off unilateral corneal	

nerves	63
4.7 The expression of inflammatory cytokines in cornea after cutting off unilateral corneal nerves.....	64
Chapter 5 Conclusion	66
Reference	67
Acknowledgement	74
Achievements	75

第一章 前言

1.1 角膜的组织结构和生理功能

1.1.1 角膜的组织结构

角膜位于眼球的前部，呈拱圆形，表面光滑，无血管和淋巴管，完全透明。角膜有很高的屈光力，占眼总屈光力的70%。

在组织学上，角膜共分为五层，组织学上由外向内分别为：上皮细胞层，前弹力层，基质层，后弹力层和内皮细胞层。

上皮细胞来源于表皮外胚层，有5-6层鳞状上皮细胞组成，有三种细胞类型，分别为浅表层细胞，翼状层细胞和基底层细胞。浅表层细胞为鳞形，细胞体积较大；中层细胞呈翼状，约2-3层；基底层细胞体积较小，为单层细胞，排列紧密，有不断分裂增殖的能力。角膜上皮细胞再生能力强，损伤后修复快且不留痕迹。角膜上皮细胞存在着一层屏障结构，是上皮细胞之间通过细胞连接相互作用形成具有选择通透作用的功能性屏障。

前弹力层又称为Bowman膜，厚度约为12um，为均质无细胞成分的透明膜。前弹力层由角膜基质演变而成，损伤后不能自行修复。

基质层为角膜最厚的一层，约占角膜厚度的90%，由近200层排列规则的胶原纤维束薄板组成。基质层中有角膜细胞和少数游走细胞，并有黏蛋白和糖蛋白补充。角膜神经纤维由此层走形分叉，并分支进入角膜上皮层。基质层来源于中胚层，损伤后不能再生。

后弹力层由角膜内皮细胞分泌而成，为坚韧的透明均质膜，损伤后可以再生。

角膜内皮细胞为一层六角形的扁平细胞构成，人类角膜内皮细胞一般不能分裂增殖。内皮细胞损伤后，由损伤周边的细胞移行过来，维持正常的角膜内皮细胞生理功能。角膜内皮细胞之间与角膜上皮细胞之间相似，存在着类似的屏障架构，细胞间形成紧密连接组织房水进入细胞外间隙。具有房水-屏障功能以及主动泵出水分维持角膜相对脱水状况的功能。

1.1.2 角膜神经

角膜富含神经纤维，角膜神经由三叉神经节眼分支的终末支睫状神经发出，有60-80支有髓神经从角膜缘呈放射状进入角膜基质。从角膜缘基质深度约2/3处长入，呈辐射状分布并分支形成基质神经丛，在基质内神经纤维继续分成2-3支构成神经丛分布于角膜各层。部分横向移行至角膜中央，一部分向上移行形成上皮下神经层，这部分神经层继续向上移行穿过前弹力层，在角膜上皮处形成上皮内神经层，角膜内皮无神经分布。在角膜上皮中表现为长条状，细枝状，以及终末分布的神经^[1]。角膜神经的这种密集分布对于维持健康的眼表环境和功能起着重要作用。分布在角膜的这些神经可以调节瞬目反射，释放神经肽、神经营养因子和生长因子^[2]。丰富的感觉神经末梢决定了角膜知觉非常敏感。

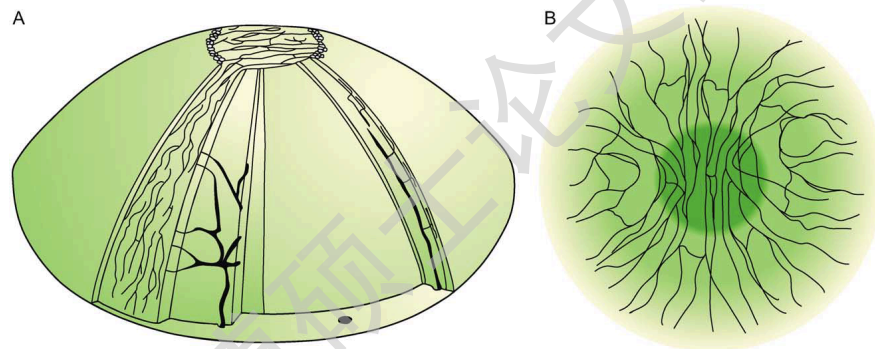


图1.1 人的角膜神经分布示意图^[2]

A.人的角膜基质和上皮下神经分布示意图，这些神经纤维主要分布在6-12, 5-11 或 7-1点方位。B.上皮下神经丛的适应性分布方向^[2]。

资料来源: Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Corneal nerves: structure, contents and function, Exp Eye Res, 2013年5月。

角膜神经以三种形态走形，一种是以长的一束一束地走形，一种是以细的树枝状走形，还有一种是以终末神经的形态走形。角膜神经密集地分布和完整的结构对于维持眼表环境的稳态十分重要。这些神经可以调节瞬目反射，释放神经肽和生长因子，还有一些神经纤维具有再生特性。角膜神经能表达一系列生物活性物质的神经化学肽，其中大部分表达P物质（substance P, SP）或降钙素基因相关肽（calcitonin gene related peptide, CGRP）^[2]。这两种神经肽都可以诱导角膜上皮的增殖、迁移、粘附，促进角膜上皮的愈合^[3, 4]。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.